

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 14, 1976, pp. 581–587

## Aktivierung der sauren Prostataphosphatase durch 1-Pentanol

Von H. Gallati

*Diagnostische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG Basel*

und M. Roth

*Laboratoire Central, Hôpital Cantonal, Genève*

(Eingegangen am 19. August/8. Oktober 1976)

**Zusammenfassung:** Die Aktivität der sauren Prostataphosphatase wird durch Zusatz von 150 mmol/l 1-Pentanol zum Testansatz um 90% erhöht. Diese Aktivierung zeigt sich in einem vermehrten Substratumsatz, indem der Phospho-monoester schneller gespalten wird und dadurch eine entsprechend größere Menge des freigesetzten, organischen Rests nachgewiesen werden kann. Die Menge des freien Phosphats entspricht hingegen nicht dem Substratumsatz, da durch eine Transphosphorylierungs-Reaktion ein Teil des Phosphatrests vom Substrat auf das 1-Pentanol übertragen wird.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluß des Substrats, des Puffers, des pH und des *L*-Tartrats auf die 1-Pentanol-aktivierte Prostataphosphatase untersucht.

### *Activation of acid prostate phosphatase by 1-pentanol*

**Summary:** The activity of the acid phosphatase from prostate was increased by 90% by the addition of 150 mmol/l 1-pentanol to the assay mixture. This activation results in an increased turnover of substrate, so that the phospho-monoester is cleaved more rapidly and a correspondingly larger amount of the released organic residue can be detected. The quantity of free phosphate, however, does not correspond to the substrate turnover, because some of the phosphate residue is transferred from the substrate to the 1-pentanol in a transphosphorylation reaction. The influence of the substrate, buffer, pH and of tartrate on the 1-pentanol-activated prostate phosphatase was investigated.

### Einführung

Alkalische Phosphatasen verschiedenen Ursprungs werden durch Aminoalkohole aktiviert, indem durch eine zusätzliche Transphosphorylierungsreaktion ein Teil des Phosphatrests vom Substrat auf den Aminoalkohol übertragen wird (1–9). Die Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie empfiehlt daher für die Standardmethode zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase im Serum oder Plasma der Testlösung 1 mol/l Diäthanolamin beizufügen (10).

Im Bestreben, auch für die diagnostisch wichtige Prostataphosphatase (EC 3.1.3.2) einen Aktivator zu finden, wurden verschiedene Substanzklassen untersucht und dabei überraschend festgestellt, daß länger-kettige Alko-

hole den Substratumsatz der Prostataphosphatase wesentlich zu steigern vermögen.

In dieser Arbeit wird der Einfluß verschiedener Alkohole auf die Aktivität der sauren Prostataphosphatase untersucht und die Testbedingungen zur Bestimmung der 1-Pentanol-aktivierten Prostataphosphatase bezüglich Substrat, Puffer, pH und Tartratkonzentration optimiert.

### Material und Methoden

Die saure Prostataphosphatase wurde mit 20 mmol/l Natrium-acetatpuffer pH 5,5 aus menschlichem Prostatagewebe extrahiert, der pH-Wert mit 100 mmol/l Essigsäure auf 4,5 erniedrigt und das Fremdprotein mit 5000 g 15 min. abzentrifugiert. Die Lösung wurde nun auf Carboxymethyl-Cellulose mit Natrium-acetatpuffer 20 mmol/l pH 4,5 und einem linearen Natrium-

chlorid-Gradienten von 0–500 mmol/l chromatographiert. Die gepoolten aktiven Fraktionen wurden eingeengt und auf Sephadex G-150 mit Natriumacetatpuffer 0,1 mol/l pH 5,5 weiter gereinigt.

Die spezifische Aktivität dieses Prostataphosphatase-Präparates betrug 500 U/mg Protein (nach l. c. (11)).

Die verwendeten Chemikalien waren analysenrein. Die Alkohole wurden von Merck (Darmstadt), die Substrate 4-Nitrophenylphosphat, Phenylphosphat, 2-Glycerophosphat und Adenosin-5-monophosphat von Fluka, CM-Cellulose von Whatmann und Sephadex G-150 von Pharmacia bezogen.

Zur Aktivitätsbestimmung der sauren Prostataphosphatase wurde 0,1 ml Enzymlösung zu 0,5 ml vorgewärmter Substratpufferlösung zugemischt und nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C die Aktivität nach Bessey et al. ((11), 4-Nitrophenylphosphat), Bastiaanse ((12), 2-Glycerophosphat, Adenosin-5'-monophosphat) oder Folin ((13), Phenylphosphat) bestimmt.

## Resultate

### Einfluß verschiedener Alkohole auf die Aktivität der sauren Prostataphosphatase

Zur Aktivitätsbestimmung der Prostataphosphatase wurden dem Testansatz (0,1 mol/l Natriumcitrat, pH 5,25 und 5 mmol/l 4-Nitrophenylphosphat) unterschiedliche Mengen der in Abbildung 1 aufgeführten Alkohole zugefügt und die entsprechenden Resultate in Prozent des alkoholfreien Testansatzes angegeben. Die Aktivierung

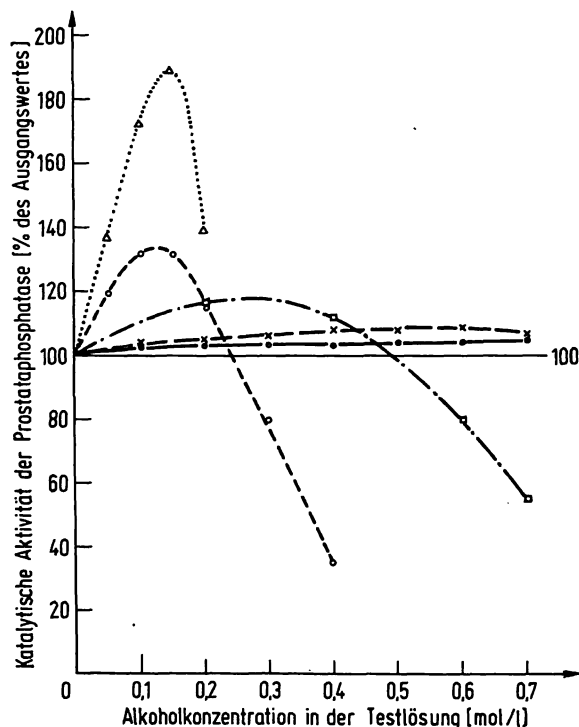


Abb. 1. Einfluß verschiedener Alkohole auf die Aktivität der Prostataphosphatase. Aktivitätsbestimmung der Prostataphosphatase in 0,1 mol/l Citratpuffer pH 5,25 mit 5 mmol/l 4-Nitrophenylphosphat und verschiedenen Konzentrationen an Methanol (—•—), Ethanol (x—x), 1-Propanol (□—□), 1-Butanol (○—○) und 1-Pentanol (Δ—Δ).

der Prostataphosphatase beträgt mit 150 mmol/l 1-Pentanol 90%, mit 150 mmol/l 1-Butanol 31%, mit 300 mmol/l 1-Propanol 18% und mit 600 mmol/l Ethanol 9%. Andererseits üben Methanol und Ethanol bis zu einer Konzentration von 1 mol/l keinen hemmenden Einfluß auf die Prostataphosphatase aus, während 1-Propanol von 500 mmol/l und 1-Butanol von 250 mmol/l an die Enzymaktivität vermindern.

Mit 100 mmol/l 1-Hexanol wird die Prostataphosphatase um 44% und mit 50 mmol/l 1-Heptanol um 22% aktiviert. Wegen der schlechten Löslichkeit kann die Konzentration dieser beiden Alkohole nicht weiter gesteigert werden.

2-Pentanol (150 mmol/l) aktiviert die Prostataphosphatase um 80%, 3-Pentanol (150 mmol/l) um 25% und 1,5-Pentandiol (200 mmol/l) um 50%. Durch D-Sorbit wird die Aktivität der Prostataphosphatase nicht beeinflusst.

Aminoalkohole, Aminosäuren, Ketosäuren, Hydroxysäuren, Mono-, Di- und Tricarbonsäuren haben auf die Prostataphosphatase-Aktivität keinen oder dann nur einen hemmenden Einfluß (Tab. 1).

### Einfluß der Art und der Konzentration des Substrates auf die 1-Pentanol-aktivierte Prostataphosphatase

Die Michaeliskonstante der Prostataphosphatase für das 4-Nitrophenylphosphat wurde in Abhängigkeit zur 1-Pentanol-Konzentration bestimmt und die entsprechen-

Tab. 1. Einfluß verschiedener Substanzen auf die Aktivität der Prostataphosphatase.

Aktivitätsbestimmung der Prostataphosphatase in 0,1 mol/l Natriumacetat pH 5,25 mit 5 mmol/l 4-Nitrophenylphosphat und mit folgenden Zusätzen in Abwesenheit von 1-Pentanol.

Zusatz	Prostataphosphatase-Aktivität (in %)
Ohne Zusatz	100
500 mmol/l 2-Ethylaminoethanol	66
500 mmol/l Triethanolamin	53
500 mmol/l Diethanolamin	43
500 mmol/l Ethanolamin	34
50 mmol/l L-Alanin	100
50 mmol/l L-Glutaminsäure	100
50 mmol/l L-Asparaginsäure	93
50 mmol/l L-Cystein	92
50 mmol/l 8-Aminocaprylsäure	54
50 mmol/l Brenztraubensäure	72
50 mmol/l 2-Oxobuttersäure	93
50 mmol/l L-Lactat	86
50 mmol/l 2-Hydroxybuttersäure	80
50 mmol/l Oxalsäure	54
50 mmol/l Bernsteinsäure	100
50 mmol/l 2-Oxoglutarinsäure	100
50 mmol/l DL-Äpfelsäure	72
50 mmol/l D-Äpfelsäure	59
50 mmol/l L-Äpfelsäure	91
50 mmol/l D-Tartrat	100
50 mmol/l L-Tartrat	0

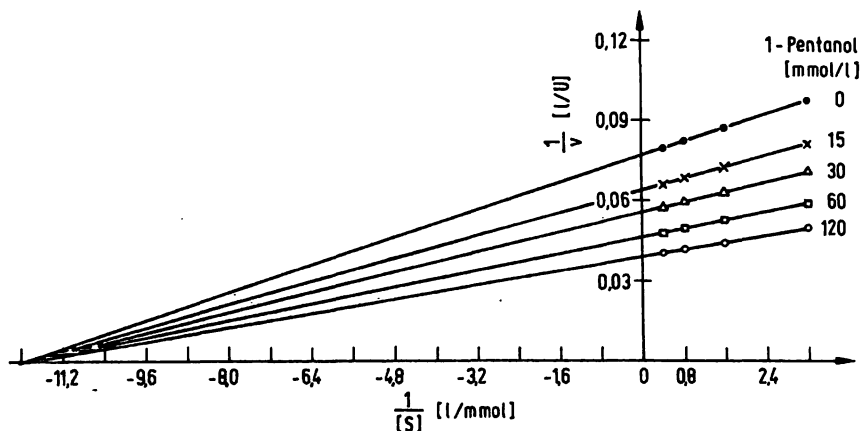


Abb. 2. *Michaeliskonstante* der Prostataphosphatase für 4-Nitrophenylphosphat in Abhängigkeit der 1-Pentanol-Konzentration. Aktivitätsbestimmung der Prostataphosphatase in 0,1 mol/l Natriumacetatpuffer pH 5,25 mit verschiedenen Konzentrationen an 1-Pentanol und 4-Nitrophenylphosphat. Darstellung nach *Lineweaver-Burk*.

den Resultate nach der Darstellungsweise von *Lineweaver-Burk* in Abbildung 2 aufgezeichnet. Daraus ist ersichtlich, daß die Substrataffinität durch den Zusatz verschiedener Mengen von 1-Pentanol zum Testansatz nicht beeinflusst wird. Die *Michaeliskonstante* für 4-Nitrophenylphosphat beträgt unter den gegebenen Testbedingungen (0,1 mol/l Natriumacetat vom pH 5,25) bei allen 1-Pentanol-Konzentrationen 83,3  $\mu\text{mol/l}$ . Hingegen nimmt die maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeit ( $V$ ) mit steigender Konzentration an 1-Pentanol deutlich zu.

1-Pentanol verhält sich der Prostataphosphatase gegenüber ähnlich wie ein Substrat. So beträgt unter den gegebenen Testbedingungen (0,1 mol/l Natriumacetat, pH 5,25) die *Michaeliskonstante* für das 1-Pentanol 250 mmol/l. Die Affinität des 1-Pentanol zur Prostataphosphatase wird durch die unterschiedliche Substratkonzentration nicht beeinflusst.

Mit Phenylphosphat als Substrat zur Bestimmung der Prostataphosphatase tritt bei Zusatz von 150 mmol/l 1-Pentanol zum Testansatz ebenfalls eine Aktivierung von 90% auf. Die *Michaeliskonstante* für Phenylphosphat wird durch 1-Pentanol nicht beeinflusst. Sie beträgt unter den gegebenen Testbedingungen (0,1 mol/l Natriumcitrat vom pH 5,25) 200  $\mu\text{mol/l}$ .

Völlig anders verhält es sich, wenn als Substrat 2-Glycerophosphat oder Adenosin-5'-monophosphat eingesetzt und die Aktivität der Prostataphosphatase durch Messung der freigesetzten Phosphationen bestimmt wird. Statt einer Aktivierung tritt bei Anwesenheit von 1-Pentanol scheinbar eine Aktivitätshemmung auf, die mit steigendem Alkoholgehalt zunimmt und bei einer Konzentration von 150 mmol/l 1-Pentanol 40% erreicht (Abb. 3). Dabei wird auch für diese beiden Substrate die *Michaeliskonstante* durch Zusatz von 1-Pentanol zur Testlösung nicht verändert. Unter den gegebenen Testbedingungen (0,1 mol/l Natriumcitrat, pH 5,25) beträgt die *Michaeliskonstante* für Adenosin-5'-monophosphat 5,26 mmol/l und für 2-Glycerophosphat 4,0 mmol/l.

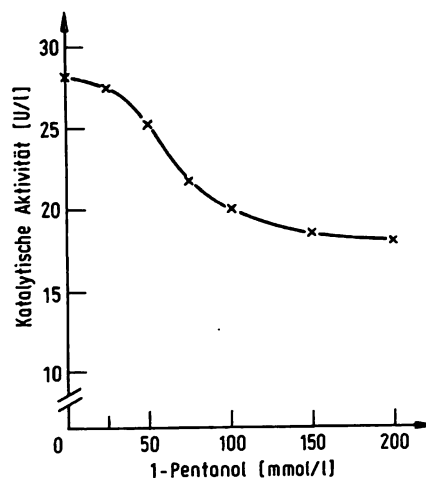


Abb. 3. Einfluß von 1-Pentanol auf die Aktivitätsmessung der Prostataphosphatase mit 2-Glycerophosphat. Aktivitätsmessung der Prostataphosphatase in 0,1 mol/l Natriumcitratpuffer pH 5,25 mit 25 mmol/l 2-Glycerophosphat und mit verschiedenen Konzentrationen an 1-Pentanol (nach l. c. (12)).

Auf Grund dieses widersprüchlichen Verhaltens des 1-Pentanol gegenüber der Prostataphosphatase wurde in einem weiteren Versuch zur Aktivitätsmessung die Konzentration sowohl des abgespaltenen, organischen Rests wie auch der freigesetzten Phosphationen bestimmt. Mit 3,0 mmol/l 4-Nitrophenylphosphatlösung in 0,1 mol/l Natriumcitrat pH 5,25 wurde Prostataphosphatase bei 37 °C inkubiert und nach bestimmten Zeitintervallen in einem Teil der Inkubationslösung gleichzeitig der Gehalt an 4-Nitrophenol und an organischem Phosphat bestimmt. Im alkoholfreien Testansatz waren die beiden Spaltprodukte bei jeder Messung in gleichmolarer Konzentration vorhanden und erreichten nach Erschöpfung des Substrates die Konzentration von 3 mmol/l. Eine Zugabe von 150 mmol/l 1-Pentanol zu der obigen Testlösung bewirkte, daß während der enzymatischen Reaktion doppelt soviel 4-Nitrophenol gefunden wurde wie anorganisches Phosphat, und daß

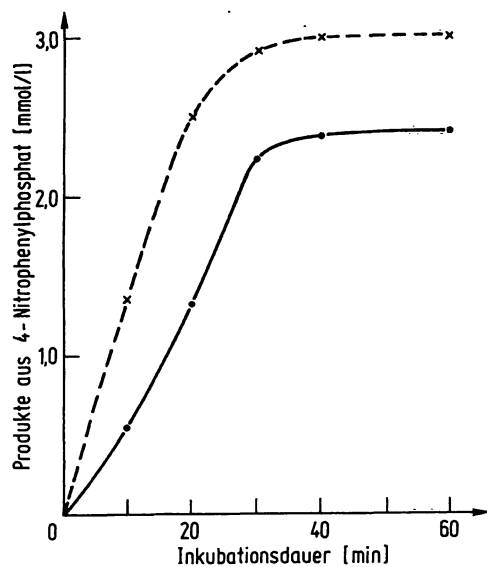


Abb. 4. Messung von 4-Nitrophenol (x---x) und anorganischem Phosphat (•—•) nach 0–60 min.  
Reaktion der Prostataphosphatase mit 4-Nitrophenylphosphat 3 mmol/l in Natriumcitrat 100 mmol/l pH 5,25 und 1-Pentanol 150 mmol/l.

nach Erschöpfung des Substrates den 3 mmol/l 4-Nitrophenol nur 2,4 mmol/l Phosphationen gegenüberstanden (Abb. 4). Im weiteren Reaktionsverlauf nahm die Phosphatkonzentration langsam zu und erreichte nach einigen Stunden den erwarteten Wert von 3 mmol/l.

#### Einfluß des pH-Wertes und des Puffers auf die 1-Pentanol-aktivierte Prostataphosphatase

Die pH-Aktivitätskurve der sauren Prostataphosphatase verläuft ohne Zusatz von 1-Pentanol im pH-Bereich von 4–6 relativ flach (Abb. 5). Durch Zusatz von 150 mmol/l 1-Pentanol zum Testansatz wird die pH-Aktivitätskurve wesentlich steiler, wobei der aktivierende Einfluß des 1-Pentanol vom pH 4 bis 5,25 stark zunimmt, um dann mit höheren pH-Werten wieder abzunehmen. Die Aktivierung der Prostataphosphatase durch 1-Pentanol ist also stark pH-abhängig, das pH-Optimum ist bei 5,25.

Das pH-Optimum wird durch unterschiedliche Konzentrationen an 4-Nitrophenylphosphat oder an 1-Pentanol nicht verändert, es ist hingegen von Substrat zu Substrat etwas verschieden.

Die maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeit (V) der Prostataphosphatase ist in Citrat- und Acetatspuffer identisch und sie wird auch durch eine unterschiedliche Pufferkonzentration nicht beeinflusst. Hingegen ist die Michaeliskonstante der Prostataphosphatase für das 4-Nitrophenylphosphat sowohl von der Pufferart wie auch von der Pufferkonzentration abhängig (Abb. 6 und Tab. 2). Mit zunehmender Puffer- und auch Salzkonzentration wird die Affinität des Substrats zum Enzym vermindert, und

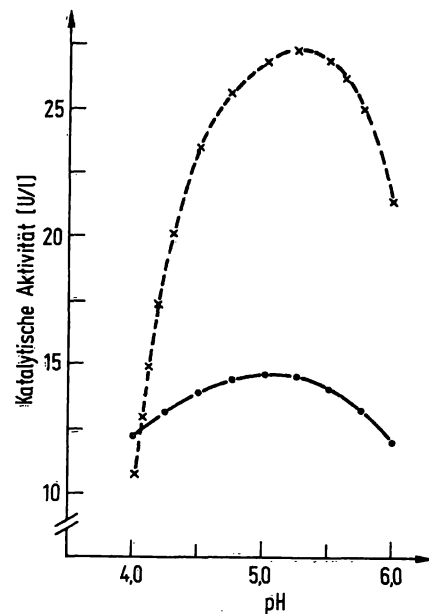


Abb. 5. pH-Aktivitätskurve der Prostataphosphatase mit und ohne 1-Pentanol-Zusatz.  
Aktivitätsbestimmung der Prostataphosphatase in 0,1 mol/l Natriumcitratpuffer mit 5 mmol/l 4-Nitrophenylphosphat.  
(•—•) ohne Zusatz von 1-Pentanol und  
(x---x) mit 150 mmol/l 1-Pentanol.

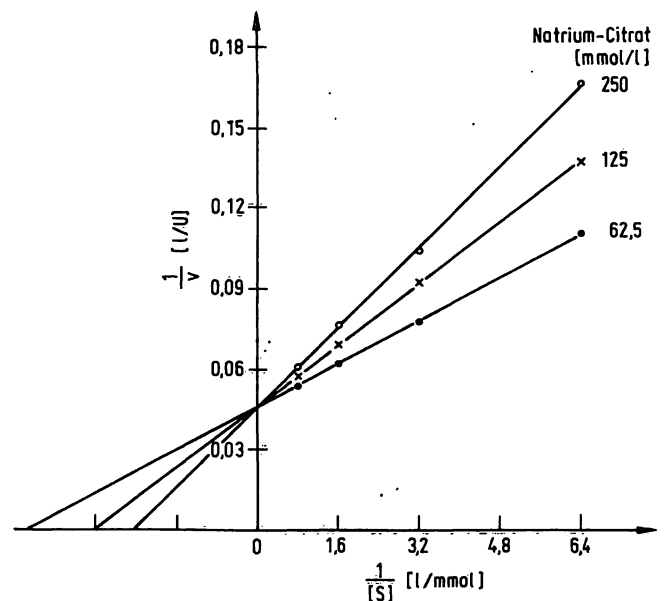


Abb. 6. Michaeliskonstante der Prostataphosphatase für 4-Nitrophenylphosphat in Abhängigkeit zur Natriumcitratkonzentration.  
Aktivitätsbestimmung der Prostataphosphatase mit unterschiedlicher Konzentration an 4-Nitrophenylphosphat und Natriumcitrat beim pH 5,25. Darstellung nach Lineweaver-Burk.

zudem ist die halbe Substratsättigung der Prostataphosphatase in Acetatspuffer schneller erreicht als in Citratpuffer.

Tab. 2. Michaeliskonstante der Prostataphosphatase für 4-Nitrophenylphosphat in Abhängigkeit der Pufferart und der Puffer- und Salzkonzentration beim pH 5,25.

Puffersystem	Michaeliskonstante ( $\mu\text{mol/l}$ ) bei folgenden Konzentrationen			
	62,5 mmol/l	125 mmol/l	250 mmol/l	500 mmol/l
Natriumcitrat	221	313	417	—
Natriumacetat	75	105	160	—
Natriumchlorid (in 0,1 mol/l Acetatpuffer)	—	230	318	496

### Einfluß gewisser Anionen auf die 1-Pentanol-aktivierte Prostataphosphatase

Die Hemmwirkung des *L*-Tartrates auf die Prostataphosphatase wird durch den Zusatz von 150 mmol/l 1-Pentanol deutlich verringert (Abb. 7). Zur vollständigen Hemmung der Prostataphosphatase muß daher die Tartratkonzentration auf 25 mmol/l heraufgesetzt werden.

Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) bis zu einer Konzentration von 50 mmol/l hat auf die Aktivität der Pro-

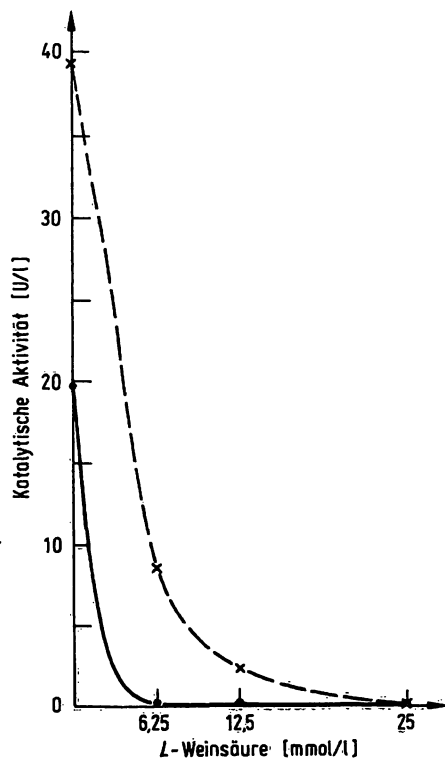


Abb. 7. Einfluß des *L*-Tartrates auf die Aktivität der Prostataphosphatase. Aktivitätsmessung der Prostataphosphatase in 0,1 mol/l Natriumcitratpuffer pH 5,25 mit 5 mmol/l 4-Nitrophenylphosphat und entsprechenden Mengen an *L*-Tartrat.  
(—•—) ohne 1-Pentanol-Zusatz resp.  
(- - - x - - -) mit 150 mmol/l 1-Pentanol.

stataphosphatase keinen Einfluß. Während Chlorid, Bromid und Jodid bis zu einer Konzentration von 100 mmol/l die Prostataphosphatase nicht beeinflussen, vermag Fluorid schon in einer Konzentration von 2 mmol/l die Aktivität dieses Enzyms vollständig zu hemmen. Diese Fluoridhemmung der Prostataphosphatase wird durch Zusatz von 150 mmol/l 1-Pentanol zum Testansatz nur unwesentlich verringert.

### Einfluß der Inkubationstemperatur und der Reaktionsdauer auf die 1-Pentanol-aktivierte Prostataphosphatase

Die Spontanhydrolyse des 4-Nitrophenylphosphates wie auch die Inaktivierung der Prostataphosphatase wird durch Zusatz von 150 mmol/l 1-Pentanol zur Testlösung im Temperaturbereich von 20 °C–40 °C nicht beschleunigt.

Der Substratumsatz nimmt bei allen untersuchten Inkubationstemperaturen von 20 °–40 °C linear zur Reaktionszeit zu (Abb. 8). Auch der Temperaturkoeffizient der 1-Pentanol-aktivierten Prostataphosphatase verändert sich nicht gegenüber dem alkoholfreien Testansatz. Erst bei Inkubationstemperaturen über 50 °C beschleunigt 1-Pentanol die Hitzedenaturierung der Prostataphosphatase.

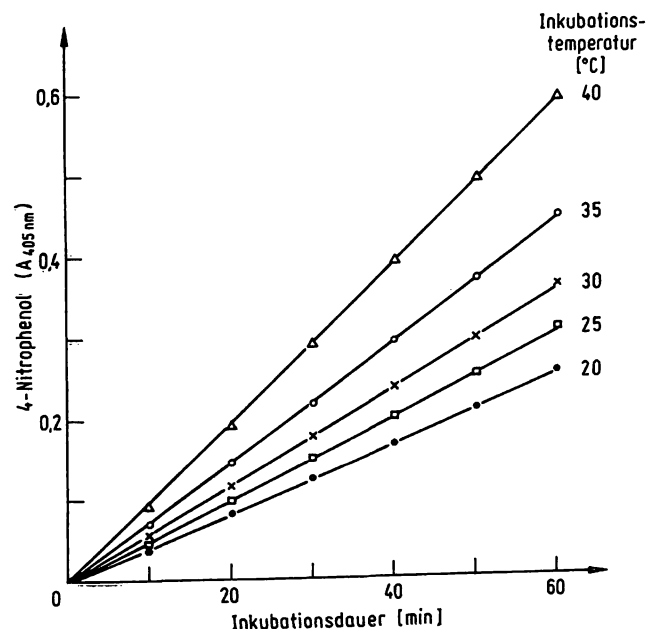


Abb. 8. Substratumsatz der Prostataphosphatase in Abhängigkeit zur Inkubationstemperatur und der Reaktionsdauer. Inkubation der Prostataphosphatase in 0,1 mol/l Natriumcitrat pH 5,25 mit 5 mmol/l 4-Nitrophenylphosphat und 150 mmol/l 1-Pentanol bei den Temperaturen 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C und 40 °C. Nach bestimmten Zeitintervallen wurde das freigesetzte 4-Nitrophenol bestimmt.

### Reagenzien zur Bestimmung der 1-Pentanol-aktivierten Prostataphosphatase im Serum und Plasma

Im Serum und Plasma sind saure Phosphatasen aus verschiedenen Organen und Zelltypen vorhanden. Die Prostataphosphatase gilt als jener Teil der Gesamtkativität der sauren Phosphatasen, der durch *L*-Tartrat gehemmt werden kann. Dementsprechend muß zur spezifischen Aktivitätsbestimmung der sauren Prostataphosphatase je ein Testansatz mit und ohne *L*-Tartrat durchgeführt werden.

#### Test zur Bestimmung der Gesamtkativität der sauren Phosphatasen

Zu

0,5 ml vorgewärmter Testlösung: 120 mmol/l Natriumcitrat,  
pH 5,25  
180 mmol/l 1-Pentanol  
6 mmol/l 4-Nitrophenylphosphat

werden

0,1 ml Serum oder Plasma zugemischt und während 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von  
2,5 ml 1 mol/l Natronlauge abgestoppt und das 4-Nitrophenolat bei der Wellenlänge 405 nm bestimmt.

#### Test zur Bestimmung der *L*-Tartrat-resistenten sauren Phosphatasen

Zu

0,5 ml vorgewärmter Testlösung: 120 mmol/l Natriumcitrat,  
pH 5,25  
25 mmol/l *L*-Tartrat  
180 mmol/l 1-Pentanol  
6 mmol/l 4-Nitrophenylphosphat

werden

0,1 ml Serum oder Plasma zugemischt und während 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von  
2,5 ml 1 mol/l Natronlauge abgestoppt und das 4-Nitrophenolat bei 405 nm bestimmt.

Zur Berechnung der Phosphatase-Aktivität (U/l) wird die gemessene Absorption ( $A_{405\text{ nm}}$ ) mit dem Faktor 55,85 multipliziert. Im Faktor 55,85 sind die Inkubationsdauer (1/30), die Relation Ansatzvolumen zu Probenvolumen (3,1 ml/0,1 ml) sowie der mikromolare Absorptionskoeffizient des 4-Nitrophenolates ( $E_{405}: 18,5\text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ ) enthalten.

Eine vergleichende Aktivitätsbestimmung der sauren Phosphatasen in einigen Kontroll- und Patientenserum einerseits mit der konventionellen und andererseits mit der oben vorgeschlagenen Testmethode hat die 90%ige Aktivierung der sauren Prostataphosphatase durch Zusatz von 150 mmol/l 1-Pentanol bestätigt. Zudem hat sich bei diesem Versuch gezeigt, daß durch 1-Pentanol auch die „Nicht-Prostata“-Phosphatasen um 70% aktiviert werden. Einzig beim Kontrollserum „Precipath E“ konnte die saure Phosphatase durch 1-Pentanol nicht aktiviert werden.

### Diskussion

Der Aktivierungsgrad der Prostataphosphatase scheint unter den gegebenen Testbedingungen von der Kettenlänge des eingesetzten Alkohols abhängig zu sein. Dabei wird mit dem 1-Pentanol die höchste Aktivierung von 90% erreicht. Bei noch höheren Alkoholen ist wegen der schlechten Löslichkeit die Alkoholkonzentration limitiert. Position sowie Anzahl der Hydroxylgruppen sind ebenfalls für die Enzymaktivierung von großer Bedeutung. Als optimal hat sich ein einwertiger primärer Alkohol (z. B. 1-Pentanol) erwiesen.

Appleyard (14) konnte durch Zusatz von 10% Ethanol zur Testlösung die saure Prostataphosphatase um etwa 80% aktivieren. Als Substrat benutzte er das Phenolphthaleinphosphat. Mit den Substraten Phenylphosphat und 4-Nitrophenylphosphat konnten wir keinen so großen Aktivierungseffekt des Ethanols feststellen. Andererseits haben unsere Versuche mit dem Phenolphthaleinphosphat gezeigt, daß die Aktivitätsbestimmung der sauren Phosphatasen mit diesem Substrat von äußerst komplexer Natur ist. Die diesbezüglichen Resultate werden an anderer Stelle mitgeteilt werden.

Substrat wie auch 1-Pentanol beeinflussen sich bezüglich ihrer Affinität zur Prostataphosphatase gegenseitig nicht. Hingegen wird die Reaktionsgeschwindigkeit durch 1-Pentanol erheblich beschleunigt. Auf Grund der dargelegten Resultate ist es naheliegend anzunehmen, daß die Prostataphosphatase neben der eigentlichen Phosphomonoesterase-Funktion auch noch die Fähigkeit besitzt, den Phosphatrest vom Substrat auf den Alkohol zu übertragen, was als Transphosphorylierung bezeichnet wird (14, 16). Diese Annahme wird durch die Beobachtung von Ostrowski (15) gestützt, der bei Anwesenheit von Ethanol in der Testlösung nach der Prostataphosphatase-Reaktion Ethylphosphat nachweisen konnte. Er fand auch, daß Ethylphosphat von der Prostataphosphatase äußerst langsam gespalten wird.

Die Transphosphorylierungsreaktion ist stark pH-abhängig. Das pH-Optimum liegt im Bereich von pH 5,2 bis 5,3. Um diesen engen pH-Bereich einhalten zu können, muß die Testlösung mit 100 mmol/l Natriumcitratpuffer versetzt werden; zur Kompensation der dadurch bedingten schlechteren Substrataffinität wird die Konzentration des 4-Nitrophenylphosphates auf 5 mmol/l heraufgesetzt.

Die Resultate der Tabelle 2 lassen vermuten, daß die Michaeliskonstante der Prostataphosphatase für 4-Nitrophenylphosphat in erster Linie von der Konzentration der Ionen und der ionisierten Gruppen abhängig ist. So ist zur Halbsättigung des Enzyms in Natriumcitratpuffer eine etwa dreifach höhere Substratkonzentration notwendig als in Natriumacetatpuffer gleichmolarer Konzentration.

Es überrascht, daß die saure Phosphatase im „Precipath E“ durch Zusatz von 1-Pentanol nicht aktiviert werden

kann. Möglicherweise wurde diesem synthetischen Enzymkontrollserum auf Albuminbasis saure Phosphatase aus Kartoffeln zugesetzt, die auf Grund unserer Versuche durch 1-Pentanol nicht aktiviert werden kann.

Wir glauben mit dieser Arbeit einen Diskussionsbeitrag im Hinblick auf die Standardisierung der Bestimmungsmethode der Prostataphosphatase geleistet zu haben. Weitere Arbeiten werden erforderlich sein, um die vor-

geschlagene Testmethode zu erproben und die von der Testmethode abhängigen Normalwerte der sauren Phosphatasen zu ermitteln.

### Danksagung

Die Autoren danken Frau J. Marque und Frä. H. Dettmar für die effiziente technische Hilfe sowie Herrn Dr. K. Lauber, med.-chem. Institut der Universität Bern für die Überlassung von Serumpools.

### Literatur

1. Amador, E., Zimmermann, T. & Wacker, W. (1963), *J. Amer. Med. Ass.* **185**, 953–957.
2. Dayan, J. & Wilson, I. (1964), *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 620–623.
3. Wilson, I., Dayan, J. & Cyr, K. (1964), *J. Biol. Chem.* **239**, 4182–4185.
4. Hausamen, T., Helger, R., Rick, W. & Gross, W. (1967), *Clin. Chim. Acta* **15**, 241–245.
5. Bowers, G., Kelley, J. & Mc Comb, R. (1967), *Clin. Chem.* **13**, 608–610.
6. Amador, E. (1972), *Clin. Chem.* **18**, 94.
7. Mc Comb, R. & Bowers, G. (1972), *Clin. Chem.* **18**, 97–104.
8. Morin, L. (1973), *Clin. Chem.* **19**, 1135–1138.
9. Neumann, H., Kezdy, F., Hsu, J. & Rosenberg, I. (1975), *Biochim. Biophys. Acta* **391**, 292–300.
10. Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (1972), *diese Z.* **10**, 182–192.
11. Bessey, O., Lowry, O. & Brock, M. (1946), *J. Biol. Chem.* **164**, 321–329.
12. Bastiaanse, A. & Meijers, C. (1968), *diese Z.* **6**, 48–51.
13. Folin, O. & Ciocalteu, V. (1927), *J. Biol. Chem.* **73**, 627–650.
14. Appleyard, J. (1948), *Biochem. J.* **42**, 596–597.
15. Ostrowski, W. & Barnard, E. (1973), *Biochemistry* **12**, 3893–3898.
16. Jeffree, G. (1957), *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 155–166.

Dr. H. Gallati  
Diagnostische Forschungsabteilung  
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG,  
Grenzacherstraße 124  
CH-4002 Basel

PD. Dr. M. Roth  
Laboratoire Central  
Hôpital Cantonal  
CH-1211 Genève 4

